

WOUND HEALING AGENT

Patent Number: JP7082172
Publication date: 1995-03-28
Inventor(s): KOYAMA MASAYOSHI; others: 02
Applicant(s): HOECHST JAPAN LTD
Requested Patent: JP7082172
Application Number: JP19930230616 19930917
Priority Number(s):
IPC Classification: A61K38/43 ; C07K14/745 ; C07K14/81
EC Classification:
Equivalents:

Abstract

PURPOSE: To provide a wound healing agent containing a kininogen fragment 1, etc., as an active component, exhibiting proliferation activation effect on fibroblast cell and having excellent stability and absorbability.

CONSTITUTION: This wound healing agent contains, as an active component, a kininogen fragment 1.2 having the amino acid sequence of the formula, preferably kininogen fragment 1 or 2. The daily application dose of the active component is preferably 1-100mug/wound in the case of topical administration.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平7-82172

(43)公開日 平成7年(1995)3月28日

(51)Int.Cl.^{*}

A 61 K 38/43

識別記号

ADT

AED

C 07 K 14/745

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

8318-4H

A 61 K 37/ 465

ADT

AED

審査請求 未請求 請求項の数9 OL (全8頁) 最終頁に続く

(21)出願番号

特願平5-230616

(71)出願人 000113137

ヘキストジャパン株式会社
東京都港区赤坂8丁目10番16号

(22)出願日

平成5年(1993)9月17日

(72)発明者 小山 政義

埼玉県川越市的場1952番地31

(72)発明者 高橋 美樹子

埼玉県蓮田市綾瀬1番11号

(72)発明者 土井 一之

東京都武蔵村山市大南5丁目19番地9

(74)代理人 弁理士 高木 千嘉 (外2名)

(54)【発明の名称】 創傷治療剤

(57)【要約】

【構成】 キニノーゲンのフラグメント1、フラグメント2、フラグメント1・2より成る創傷治療剤。

【効果】 上記キニノーゲンのフラグメント1、フラグメント2及びフラグメント1・2は線維芽細胞の増殖促進活性を有するので創傷治療剤として有用である。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 キニノーゲンフラグメント1・2を有効成分とする創傷治療剤。

【請求項2】 キニノーゲンフラグメント1を有効成分とする創傷治療剤。

【請求項3】 キニノーゲンフラグメント2を有効成分とする創傷治療剤。

【請求項4】 配列番号：1のウシのキニノーゲンフラグメント1・2である請求項1の創傷治療剤。

【請求項5】 配列番号：2のウシのキニノーゲンフラグメント1である請求項2の創傷治療剤。

【請求項6】 配列番号：3のウシのキニノーゲンフラグメント2である請求項3の創傷治療剤。

【請求項7】 配列番号：4のヒトキニノーゲンのウシキニノーゲンフラグメント1・2に対応する部分ペプチドを有効成分とする創傷治療剤。

【請求項8】 配列番号：5のヒトキニノーゲンのウシキニノーゲンフラグメント1に対応する部分ペプチドを有効成分とする創傷治療剤。

【請求項9】 配列番号：6のヒトキニノーゲンのウシキニノーゲンフラグメント2に対応する部分ペプチドを有効成分とする創傷治療剤。 20

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、キニノーゲンのフラグメント1・2及びその等価物を有効成分とする創傷治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】キニノーゲンは血管拡張、血圧低下及び子宮平滑筋の収縮などの作用を有する生理活性ペプチドであるキニンの前駆体蛋白として早くから知られてきた。またキニノーゲン自体の働きとして、キニノーゲンが血液凝固因子の前駆体と複合体を形成し、血管内皮の傷害部位に沈着することで内因性の血液凝固を開始させる作用を有することが知られてきた。また最近になって、システインプロテアーゼインヒビター活性がキニノーゲンのH-鎖領域に存在することが明らかにされている(Ohkubo et al., Biochemistry vol.23, p.5691~5697, 1984)。更にキニノーゲンは、炎症時に血中内で急激にその濃度が増加する急性期反応物質(acute phase reactant)のひとつであることも明らかにされ(Furuto-Kato et al., J. Biol. Chem. vol.260, p.12054~12059, 1985)、炎症に対する生体側の防御反応に関与していることが示唆されている。このようにキニノーゲンは、非常に多機能を有する蛋白質である。

【0003】キニノーゲンはラット、ウシ、ウマ及びヒトにおいて精製されており、その他の哺乳類の血液中にも広くみられる。主として、分子量が88~114Kdの高分子量キニノーゲン(high molecular weight-kininogen、又は、HMWキニノーゲン)と分子量が58~

68Kdの低分子量キニノーゲン(low molecular weight-kininogen、又は、LMWキニノーゲン)に分けられる。それぞれのキニノーゲンの分子量は動物種によって少しづつ異なっている。これらのキニノーゲンは、主に肝臓で合成される。肝臓から血液中に分泌され、血流によって全身の血管系に分布する。いずれのキニノーゲンもカリクレイン様プロテアーゼにより2ヶ所又は3ヶ所切断され、種々のキニンを遊離する。

【0004】ウシのHMW-キニノーゲンは最初に精製され、その性質及びアミノ酸配列が調べられている。ウシHMW-キニノーゲンは、カリクレイン様プロテアーゼにより分解をうけ、キニン及びフラグメント1・2と呼ばれる2種のペプチドフラグメントを遊離し、残りはN末端側の重鎖フラグメント(H-鎖)とC末端側の軽鎖フラグメント(L-鎖)がジスルフィド結合で共有結合したキニンフリーキニノーゲンとなる。ウマHMW-キニノーゲンもウシと同様の分解をうけ、キニン及びフラグメント1・2の2種のペプチドフラグメントを遊離する。

【0005】他方、ヒト由来のHMW-キニノーゲンもカリクレイン様プロテアーゼ処理によりキニンを遊離する。しかし、ウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2に対応する部分は遊離されず、キニンフリーキニノーゲンのL-鎖のN末端に結合したままである。

【0006】ウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2は、最初のメチオニン残基を1番目としたとき、387番目のセリン残基から496番目のアルギニン残基までのアミノ酸残基にして110個の長さをもつペプチドフラグメントである。更に、長時間カリクレイン様プロテアーゼで処理することにより、アミノ酸残基にして69個のフラグメント1と41個のフラグメント2に分解される。

【0007】フラグメント1・2は、非常にヒスチジン残基に富む塩基性のペプチドフラグメントである。特にフラグメント2においてはヒスチジン残基の含量は41残基中11個と多く、その他のリシン、アルギニン残基の如く塩基性アミノ酸残基の含量は合せて41残基中19個となり、一方、酸性アミノ酸残基はアスパラギン残基1個であることから、全体として著しくプラスに荷電した塩基性のフラグメントである。またフラグメント1でも、69個のアミノ酸残基中、ヒスチジンは11個を含む19個の塩基性アミノ酸残基を有する塩基性フラグメントである。

【0008】HMW-キニノーゲンのフラグメント1・2の生理活性については、キニノーゲンが内因性の血液凝固を開始させる際、キニノーゲンと血液凝固因子前駆体の複合体を血管内皮下表面(subendothelial surface)の傷害部位に結合させる働きが予想されているのみで、その他のフラグメント1・2に関する機能は知られていなかった(Allen et al., Blood vol.70, p.1~15,

1987).

【0009】一方、創傷治療の過程において種々の成長因子が関与していることが知られている (Dijke et al., Biotechnology vol.7, p.793~798, 1989)。特に、TGF- β (transforming growth factor- β) や PDGF (platelet-derived growth factor) は、線維芽細胞を増殖させ、障害部位へ細胞を誘引し、創傷の修復を促進することが知られている。しかし、キニノーゲンのフラグメント1・2が線維芽細胞を増殖させたり、創傷治療に効果があるという報告はこれまでなされていなかった。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】したがって、本発明の課題は創傷治療に対して効果のある新たな治療薬として用いることのできるペプチドを提供することである。より詳しくは、従来知られていた創傷治療効果が示唆されていた TGF- β 、PDGF の如くそれ自体多機能を有する生理活性物質は創傷治療以外の望ましくない作用を有することも考えられるので、そのような副次的な活性を有せず、より創傷治療に特異的に作用するペプチドをこの目的に使用することが望まれていた。

【0011】

【課題を解決するための手段】ヒトを含む哺乳類動物の胎児及び新生児の血液中には、成長の激しい胎児及び新生児の各細胞組織の成長を刺激する種々の成長因子が含有されることが考えられる。量的に入手しやすいウシ新生児血清を出発原料として、新たな線維芽細胞増殖活性を有する蛋白因子の精製分離を試みた。線維芽細胞増殖活性測定のためには、例えば、Ba 1b / 3T3細胞株が使用できる。

【0012】種々の成長因子は、ヘパリンに結合しやすいことが知られていたので、まず、ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフィでカラムに結合する画分を分離し、ついで逆相液体クロマトグラフにより、さらに細かい画分に分けることができる。これらの各画分について線維芽細胞増殖活性を測定した。こうして得られた活性画分のひとつについて、N末端のアミノ酸配列及びアミノ酸組成を決定し、蛋白質及び遺伝子配列データベースと参照して公知の蛋白質であるかどうか調べた。

【0013】その結果、公知のウシ HMW-キニノーゲンのアミノ酸配列の一部、すなわちフラグメント1・2のN末端からのアミノ酸配列に一致した。更に、アミノ酸組成分析により、この活性画分は塩基性のウシ HMW-キニノーゲンのフラグメント1・2であることが同定された。

【0014】このフラグメント1・2は更にウシのカリクレイン様プロテアーゼにより、フラグメント1とフラグメント2に分解することが知られている。これらの分解フラグメントについても、いずれも極めて塩基性の高いアミノ酸残基、中でもヒスチジンに富んだ特徴的な一

次構造を有していることから、元のフラグメント1・2と同様に線維芽細胞増殖活性を有することが強く示唆される。より短い活性フラグメントは安定性及び吸収性が高いことが期待され、また、合成もしやすいことから薬剤としてより優れていると考えられる。

【0015】ヒト HMW-キニノーゲンについては、カリクレイン様プロテアーゼにより、ウシ HMW-キニノーゲンのようなフラグメント1・2が生ずることはない。しかし、ヒト HMW-キニノーゲンの最初のメチオニン残基を1番目としたときの390番目のセリン残基から510番目のリジン残基に至るペプチドフラグメントはウシ HMW-キニノーゲンのフラグメント1・2に対応する。さらに、ヒト HMW-キニノーゲンの390番目のセリン残基から457番目のアルギニン残基及び458番目のグリシン残基から520番目のリジン残基に至るペプチドフラグメントはフラグメント1・2の分解フラグメントである、ウシのフラグメント1及びフラグメント2に対応する。各々のヒト HMW-キニノーゲンフラグメントともヒスチジン残基に富み且つその他のリジン、アルギニンといった塩基性アミノ酸残基にも富んでいるという、ウシフラグメント1・2及びその分解フラグメントによく似た特性を有している。

【0016】このために、これらのヒト HMW-キニノーゲンのウシフラグメント1・2様ペプチドフラグメントも創傷治療に効果がある。ただし、これらヒトのウシフラグメント1・2様ペプチドは天然型では血中に分泌されないので、これらのペプチドを化学的に合成するか、これらのペプチドをコードする遺伝子を合成して遺伝子工学的方法により生産する。

【0017】他の哺乳類に関しても、ウシ型 HMW-キニノーゲンのようにフラグメント1・2を生ずる場合は、天然原料からの精製により、ヒト型の場合は合成等により、目的のペプチドフラグメントを得ることができる。

【0018】これらのペプチドフラグメントは、線維芽細胞増殖作用を失わせずに、若干のアミノ酸残基の変更や化学修飾を加えることにより、更に製剤に適したペプチドとなることが期待できる。

【0019】これらのペプチドは、水溶性が高く、創傷治療には適当な水溶性基剤と混合して局所的に直接幹部に塗布する投与法が最もふさわしいが、その他にも全身性投与として、静脈内注射剤又は皮下投与剤として投与することができ、また、微粒子のエアロゾル製剤として、経鼻又は経肺的に投与することができる。

【0020】投与量は、局所投与では1~100 μg /投与部位/人/日、また全身性投与では0.1~1.0 mg/kg/日を投与する。

【0021】以下に実施例により、本発明を更に詳しく説明する。

【実施例】

実施例1 ウシの新生児血清よりの線維芽細胞(Balb/3T3細胞)増殖促進因子の精製

1) ヘパリンアフィニティクロマトグラフィー法による粗精製

ウシ新生児血清(GIBCO Laboratories社より購入)1リットルに塩化ナトリウムを20.5g加える。この新生児血清を、あらかじめトリス緩衝液A(20mM Tris-HCl pH 7.5, 0.5M NaCl)で平衡化しておいたヘパリンートヨパールカラム(5cm×5.5cm, 東ソー社)に流速3ml/分で展開する。その後、トリス緩衝液Aで同カラムを充分に洗浄する。洗浄後、ヘパリンートヨパールカラムに吸着したペプチド又は蛋白質をトリス緩衝液B(20mM Tris-HCl pH 7.5, 1.0M NaCl)で溶出する。溶出液は吸光度光度計を用い、280nmの吸光度によりモニターし、吸収度の高い画分、約300mlを採取した。

【0022】2) 逆相液体クロマトグラフィー法による精製

操作1) で得た溶出液を、あらかじめ0.1%のトリフルオロ酢酸(TFA)を含有する水で平衡化しておいたコスモシール5C18-300カラム(4.6×250mm、ナカライテスク社)に展開し、0.1%TFAを含む水で十分に洗浄した。その後、吸着したペプチド又は蛋白質をアセトニトリル濃度にして0~80%のリニアグラジェントにより溶出した。溶出液は、214nmの吸光度によりモニターし、ピークごとに採取した。溶出パターンを図1に示す。

【0023】実施例2 線維芽細胞増殖促進活性の測定
線維芽細胞株のBalb/3T3細胞(ATCCより購*

本活性画分 SVQVMKTEGSxxVSLPHxAM

V

387

406

ウシキニノーゲン(部分) SVQVMKTEGSTPVSLPHSAM

T V

【0026】この表1の本活性画分においてxで示された、397、398及び404番目のアミノ酸残基は、糖の側鎖を有することが報告されているアミノ酸であり、そのことにより、アミノ酸シークエンサーによるアミノ酸残基の同定ができなかったと考えられる。また、本実験においては401番目はロイシン及びバリンの両方の可能性があるという結果を得たが、この401番目及び他の398番目と455番目のアミノ酸残基に関しては、ウシHMW-キニノーゲンについて、それぞれ、文献的に2種のアミノ酸が報告されている残基である(Kato H. et al., Methods Enzymol. vol. 80, p.172~198, 1981)。

【0027】2) アミノ酸組成分析

また、ピーク1の画分のペプチドをアミノ酸分析機により、アミノ酸組成を調べたところ、ウシのHMW-キニ※50

*入)を96ウェル培養プレートに1ウェル当たり 5×10^3 個播種し、10%仔牛血清添加グルベーコ改変イグルMEM培地(以下DME)100μlを加え、培養器中で24時間、37°Cで培養した。その後培養液を除き、細胞を洗浄後、低血清培地(0.2%仔牛血清添加DME)100μlを加え、更に3日間培養した。そこへ実施例1により得た各画分を10μl加え、15時間培養した。ついで、³H-チミジンを74KBq/m1になるよう加え、6時間培養した。培養後培地を除き、細胞を集め細胞中に取込まれた³H-チミジンの量を測定した。その結果、図1中のピーク1(矢印)の画分に細胞増殖促進活性が認められた。

【0024】実施例3 ピーク1のペプチドの物理化学的性質の測定

1) N末端アミノ酸配列分析

実施例2で活性が確認された画分のペプチドにつき、N末端配列をアミノ酸シークエンサー、モデル477A(アプライトバイオシステムズ社)により分析したところ、下に示すアミノ酸配列が確認された。この配列を蛋白データベースにより、一致するものがあるか否かを調べたところ、ウシのHMW-キニノーゲンの387番目から406番目の配列と、アミノ酸が同定できなかった397番目、398番目及び404番目を除いて一致していることが確認された。表1にウシHMW-キニノーゲンの387番目から404番目のアミノ酸部分配列と確認されたアミノ末端配列を示す。

【0025】

【表1】

※ノーゲンの387番目から496番目のフラグメント、すなわちフラグメント1・2のアミノ酸組成に一致した。表2にアミノ酸組成分析の結果を示す。

【0028】

40 【表2】

| アミノ酸 | 7 本件分析結果 | 理論値(*1) |
|---------|-------------|---------|
| Asp/Asn | 8.2 | 8 |
| Glu/Gln | 10.6 | 11 |
| Ser | 7.2 | 7 |
| Gly | 22.0 | 22 |
| His | 21.7 | 22 |
| Arg | 3.3 | 3 |
| Thr | 3.8 | 4 |
| Ala | 1.6 | 1 |
| Pro | 3.4 | 3 |
| Tyr | 1.4 | 1 |
| Val | 3.7 | 4 |
| Met | 1.9 | 2 |
| 1/2Cys | 0.0 | 0 |
| Ile | 0.9 | 1 |
| Leu | 5.5 | 6 |
| Phe | 0.0 | 0 |
| Lys | 12.6 | 13 |
| Trp | N.D.(*2) | 2 |
| 合計 | | 110 |

*1 Han.Y.N. et.al. J.Biochem. vol.83, p.213~221(1978)より

*2 未決定

【0029】3) 電気泳動による分析

ピーク1のペプチドの分子量を還元条件下のSDS電気泳動により確認したところ、約21Kdの分子量を示した。この分子量は報告されているウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2の分子量と一致する(Han.Y.N. et.al. J.Biochem. vol.79, p.1201~1222, 1976)。

【0030】以上、表1、2及び3)に示された結果より、線維芽細胞の増殖活性を有するピーク1のペプチドはウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2であると確認された。

【0031】実施例4 ウシHMW-キニノーゲンから*

| 添加化合物 | 用量($\mu\text{g}/\text{ml}$) |
|-----------|-------------------------------|
| 対照群 | - |
| フラグメント1・2 | 0.3 |
| | 1.0 |
| | 3.0 |
| | 10.0 |

この結果から、ウシHMW-キニノーゲンフラグメント1・2は用量依存的に細胞増殖促進活性を有することが確認された。

【0035】

8 *のフラグメント1・2、1及び2の調製

1) ウシHMW-キニノーゲンからのフラグメント1・2の調製

フラグメント1・2の調整はHanらの方法(J. Biochem v ol.83, p.213~221, 1978)に従って行った。ウシHM W-キニノーゲン(生化学工業より購入)5mgを0.2M炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH8.0)50μlに溶解し、ウシ血漿カリクレイン4.5μgを加え、37°Cにて1時間加温した。その後、DFP(Diisopropyl phosphothioride)を最終濃度 $1.7 \times 10^{-2}\text{M}$ になるように加え、反応を停止した。これを、0.2M炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-75カラム(1.6×60cm)にてゲルろ過を行い、フラグメント1・2を得た。

【0032】2) フラグメント1、フラグメント2の調製

フラグメント1及びフラグメント2の調整はHanらの方法(文献上述)に従って行った。即ち、1)で得られたフラグメント1・2にウシ血漿カリクレインを重量比1/1100になるように反応させ、フラグメント1とフラグメント2に断片化した。DFPにより反応を停止した後、反応液から、0.2M炭酸水素アンモニウム緩衝液(pH8.0)で平衡化したセファデックスG-75カラム(1.6×60cm)にてゲルろ過を行うことにより、それぞれフラグメント1、フラグメント2を得た。

【0033】実施例5 ウシHMW-キニノーゲンのフラグメント1・2の線維芽細胞増殖活性の測定

実施例4により得たフラグメント1・2を、実施例2の方法に従い、各ウエル当たり $0.03 \sim 10\text{ }\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように加え、³H-チミジンの取り込みを測定した。フラグメント1・2の線維芽細胞増殖活性の測定の結果を表3に示す。各カラムは各群の平均と標準偏差を示す。t検定により、対照群に対して、*は $p < 0.05$ で、また**は $p < 0.001$ で有意差がみられたことを示す。

【0034】

【表3】

³H-チミジンの取り込み(cpm)

| |
|------------------|
| 437.0 ± 57.4 |
| 561.6 ± 49.7* |
| 1252.9 ± 122.6* |
| 3186.4 ± 451.7** |
| 8299.4 ± 510.9** |

※【効果】本発明により提供されるHMW-キニノーゲンのフラグメント1、フラグメント2及びフラグメント1・2は線維芽細胞の増殖促進活性を有するので創傷治療剤として有用である。

【0036】

【配列表】

配列番号：1

配列の長さ：110

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

* 生物名：ウシ (Bos taurus)

組織の種類：血清

配列の特徴：

存在位置：ウシHMW-キニノーゲンの387~496

番目のペプチドフラグメント

他の情報：12番目のXaaは、Pro又はThr、15番目のXaaは、Val又はLeu、69番目のXaaは、Lys又はArgを示す。

*

配列：

Ser Val Gln Val Met Lys Thr Glu Gly Ser Thr Xaa Val Ser Xaa Pro
 1 5 10 15
 His Ser Ala Met Ser Pro Val Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys
 20 25 30
 Glu Gln Gly Pro Thr His Gly His Gly Trp Asp His Gly Lys Gln Ile
 35 40 45
 Lys Leu His Gly Leu Gly Leu Gly His Lys His Asp Gln Gly
 50 55 60
 His Gly His His Xaa Ser His Gly Leu Gly His Gly His Gln Lys Gln
 65 70 75 80
 His Gly Leu Gly His Gly His Lys His Gly His Gly His Lys His
 85 90 95
 Lys Asn Lys Gly Lys Asn Asn Gly Lys His Tyr Asp Trp Arg
 100 105 110

【0037】配列番号：2

配列の長さ：69

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

起源：

生物名：ウシ (Bos taurus)

※ 組織の種類：血清

配列の特徴：

存在位置：ウシHMW-キニノーゲンの387~455

番目のペプチドフラグメント

他の情報：12番目のXaaは、Pro又はThr、15番目のXaaは、Val又はLeu、69番目のXaaは、Lys又はArgを示す。

※

配列：

Ser Val Gln Val Met Lys Thr Glu Gly Ser Thr Xaa Val Ser Xaa Pro
 1 5 10 15
 His Ser Ala Met Ser Pro Val Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys
 20 25 30
 Glu Gln Gly Pro Thr His Gly His Gly Trp Asp His Gly Lys Gln Ile
 35 40 45
 Lys Leu His Gly Leu Gly Leu Gly His Lys His Lys His Asp Gln Gly
 50 55 60
 His Gly His His Xaa
 65

【0038】配列番号：3

配列の長さ：41

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

配列：

★ 起源：

生物名：ウシ (Bos taurus)

組織の種類：血清

配列の特徴：

存在位置：ウシHMW-キニノーゲンの456~496

番目のペプチドフラグメント

★

11 12
 Ser His Gly Leu Gly His Gly His Gln Lys Gln His Gly Leu Gly His
 1 5 10 15
 Gly His Lys His Gly His Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys
 20 25 30
 Asn Asn Gly Lys His Tyr Asp Trp Arg
 35 40

【0039】配列番号：4

配列の長さ：131

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

* 起源：

生物名：ヒト (*Homo sapiens*)

組織の種類：血清

10 配列の特徴：

存在位置：ヒト HMW-キニノーゲンの390～520

* 番目のペプチドフラグメント

配列：

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro
 1 5 10 15
 His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys
 20 25 30
 Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg
 35 40 45
 Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
 50 55 60
 Gly His Gln Arg Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His
 65 70 75 80
 Gly Leu Gly His Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His
 85 90 95
 Gln Gly Gly His Val Leu Asp His Gly His Lys His Lys His Gly His
 100 105 110
 Gly His Gly Lys His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn
 115 120 125
 Gly Trp Lys
 130

【0040】配列番号：5

配列の長さ：68

配列の型：アミノ酸

トポロジー：直鎖状

配列の種類：ペプチド

フラグメント型：中間部フラグメント

※起源：

生物名：ヒト (*Homo sapiens*)

組織の種類：血清

配列の特徴：

存在位置：ヒト HMW-キニノーゲンの390～457

※ 番目のペプチドフラグメント

配列：

Ser Ser Arg Ile Gly Glu Ile Lys Glu Glu Thr Thr Val Ser Pro Pro
 1 5 10 15
 His Thr Ser Met Ala Pro Ala Gln Asp Glu Glu Arg Asp Ser Gly Lys
 20 25 30
 Glu Gln Gly His Thr Arg Arg His Asp Trp Gly His Glu Lys Gln Arg
 35 40 45
 Lys His Asn Leu Gly His Gly His Lys His Glu Arg Asp Gln Gly His
 50 55 60
 Gly His Gln Arg
 65

【0041】配列番号：6

配列の長さ：63

★配列の型：アミノ酸

★50 トポロジー：直鎖状

13

14

配列の種類：ペプチド

* 組織の種類：血清

フラグメント型：中間部フラグメント

配列の特徴：

起源：

存在位置：ヒト HMW-キニノーゲンの458～520

生物名：ヒト (*Homo sapiens*)

* 番目のペプチドフラグメント

配列：

Gly His Gly Leu Gly His Gly His Glu Gln Gln His Gly Leu Gly His

1 5 10 15

Gly His Lys Phe Lys Leu Asp Asp Asp Leu Glu His Gln Gly Gly His

20 25 30

Val Leu Asp His Gly His Lys His Gly His Gly His Gly Lys

35 40 45

His Lys Asn Lys Gly Lys Lys Asn Gly Lys His Asn Gly Trp Lys

50 55 60

【図面の簡単な説明】

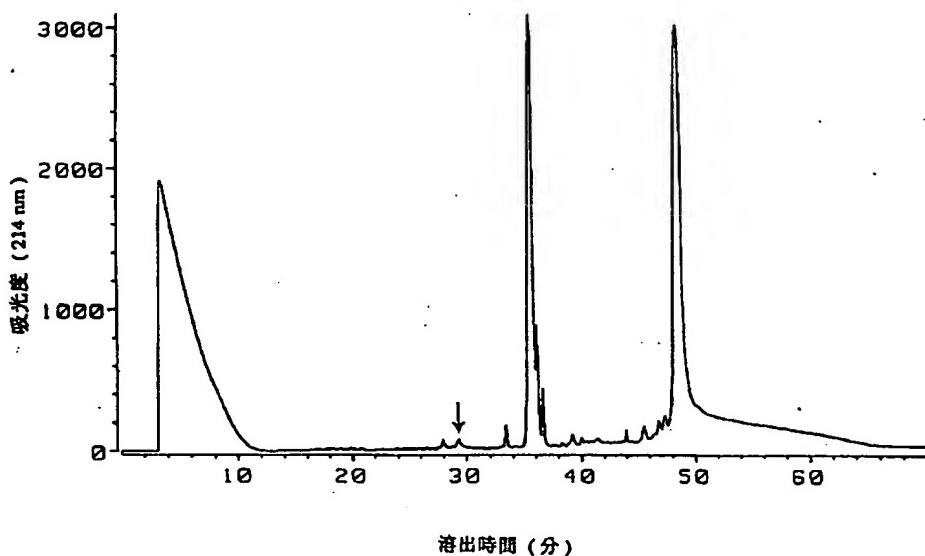
※ラフィーにより展開したパターンを示す。矢印は本件の

【図1】ヘパリンアフィニティカラムクロマトグラフに

フラグメント1・2を含む活性画分である。

結合し、溶出された画分をさらに、逆相液体クロマトグ※

【図1】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. 6

識別記号

府内整理番号

F I

C 07 K 14/81

8318-4H

技術表示箇所